



RECEIVED

JUN 20 2001

TECH CENTER 1600/2900

1645

#B

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application : Walter Schubert
 Application No. : 09/808,224
 Filed : March 14, 2001
 For : PROCESS FOR IDENTIFYING CELL-SPECIFIC TARGET
 STRUCTURES
 Attorney's Docket : HSS-015XX

Group Art Unit: 1645

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on June 12, 2001

By

Charles L. Gagnebin III
 Charles L. Gagnebin III
 Registration No. 25,467
 Attorney for Applicant

PRIORITY CLAIM UNDER RULE 55

Commissioner for Patents
 Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date in Germany of a patent application corresponding to the above-identified application is hereby claimed under Rule 55 and 35 U.S.C. 119 in accordance with the Paris Convention for the Protection of Industrial Property. This benefit is claimed based upon a corresponding German patent application bearing serial no. 100 14 685.6 filed March 24, 2000, a certified copy of which is attached hereto.

Respectfully submitted,

WALTER SCHUBERT

By

Charles L. Gagnebin III
 Charles L. Gagnebin III
 Registration No. 25,467
 Attorney for Applicant

WEINGARTEN, SCHURGIN,
 GAGNEBIN & HAYES LLP
 Ten Post Office Square
 Boston, Massachusetts 02109
 Telephone: (617) 542-2290
 Telecopier: (617) 451-0313

CLG/jde/251946
 Enclosure

RECEIVED
 JUN 19 2001
 TC 1700 MAIL ROOM



U55N 09/808,224
WEINGARTEN SCHURGIN
GAGNEBIN & HAYES LLP
H55-015 XX



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:	100 14 685.6
Anmeldetag:	24. März 2000
Anmelder/Inhaber:	Dr. Walter Schubert, Biederitz/DE
Bezeichnung:	Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Zielstrukturen
IPC:	C 12 Q 1/04

RECEIVED
JUN 19 2001
TC 1700 MAIL ROOM

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. März 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Jerofsky

5

Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Zielstrukturen

BESCHREIBUNG:

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Zielstrukturen.

Die Identifizierung zellspezifischer Zielstrukturen ist von zentraler Bedeutung bei der
15 Aufklärung von Zell-Zell-Interaktionen, die unzählige Wirkungen innerhalb eines Organismus nach sich ziehen können. Insbesondere die Kenntnis krankheitsspezifische Zielstrukturen ist eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung wirksamer und gleichzeitig nebenwirkungsarmer Arzneimittel.

20 Es ist bekannt, daß Immunzellen (Lymphozyten) spezifische Kombinationen von Proteinen, auch Proteinkombinationsmuster bzw. kurz PKM genannt, exprimieren, die für eine Bindung an Endothelzellen der Blutgefäße von Gehirn und Muskelgewebe verantwortlich sind. Andere
Kombinationen von Proteinen führen dagegen nicht zu einer Bindung an diese Endothelzellen. Überraschenderweise sind diese spezifischen Kombinationen interindividuell
25 konstant und weisen immer dieselben Bindungsfunktionen auf. Es scheint sich folglich bei den spezifischen Proteinkombinationsmustern um einen interindividuellen konstanten Lymphozyten Bindungs-Code der Zelloberfläche für organspezifische Endothelzell-
oberflächen zu handeln, der eine zellspezifische Zielstruktur darstellt. Zellspezifische Zielstrukturen können folglich ganz spezifische Proteinkombinationsmuster aufweisen.

30

Auch invasive Tumorzellen verfügen über spezifische Proteinkombinationsmuster an ihren Zelloberflächen, die zu einem gezielten, d.h. organspezifischen Invasionsverhalten führen. Solche Proteinkombinationsmuster stellen daher Zielstrukturen für mögliche Arzneimittel

dar.

Unbedingte Voraussetzung für die Entwicklung solcher hoch-selektiver Arzneimittel ist jedoch die Kenntnis der molekularen Zusammensetzung dieser Zielstrukturen.

5

Aus dem Stand der Technik sind Verfahren zur Identifizierung von Zielstrukturen bekannt, die auf der Analyse von Gen-Expressionsprofilen von kranken Geweben oder Zellen im Vergleich zu Gen-Expressionsprofilen von gesunden Geweben oder Zellen beruhen, wobei sowohl Proteinexpressionsprofile als auch Expressionsprofile der Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Aufschluß über das Auftreten neuer Proteine, fehlregulierter oder abnorm modifizierter Proteine in kranken Geweben oder Zellen geben sollen (z.B. in: F. Lottspeich/H.Zorbas; Bioanalytik; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, 1998).

15 Diese Verfahren gehen jedoch alle von Zellhomogenaten aus, denen in der Regel Tausende oder Millionen von Zellen zugrunde liegen, da nur mit Hilfe dieser Zellmengen Expressionsprofile der oben genannten Art erstellt werden können. In den Zellhomogenaten liegen die Zellen in aufgeschlossener Form vor, damit die Proteine oder mRNA-Moleküle mit Hilfe biochemischer Verfahren extrahiert und getrennt werden können.

20 Nachteilig an diesen bekannten Verfahren ist jedoch, daß sie nicht dazu geeignet sind, Proteinkombinationsmuster zu identifizieren, da die einzelnen Proteinkomponenten eines solchen Proteinkombinationsmusters durch die Erzeugung von Zellhomogenaten und durch die darauffolgenden Extraktionsvorgänge vollständig getrennt werden und die wesentliche Information bezüglich ihrer zell- und gewebetopologischen Lage verloren geht. Durch die Zerstörung der Zellkompartimente können weiterhin keine Informationen bezüglich der Kombinationen von Proteinen innerhalb dieser Zellkompartimente und ihre relative topologische Beziehung zueinander gewonnen werden.

30 Ein weiterer Nachteil der bekannten Verfahren ist außerdem, daß keine Analytik auf dem Einzelzellniveau durchführbar ist, so daß Unterschiede der einzelnen Zellen bezüglich ihrer Proteinkombinationsmuster nicht erfaßbar sind. Außerdem können Proteine, die nur in geringer Menge vorliegen, durch die bekannten Verfahren nicht detektiert werden. Dies betrifft insbesondere Proteine oder spezifische Proteinkombinationen, die beispielsweise nur

in wenigen, jedoch pathogenen, krankheitsspezifischen Zellen vorkommen.

Ein weiterer Nachteil der bekannten Verfahren besteht darin, daß die Präparationsschritte des Gewebes oder der Zellen von ihrer Entnahme oder Gewinnung bis zum Schritt der Isolierung bzw. Auftrennung von Proteinen einer großen Zahl von variablen externen Einflüssen unterliegen können, die nur schwer kontrollierbar und zu vereinheitlichen sind.

Aufgabe der Erfindung ist es daher ein Verfahren der oben genannten Art bereitzustellen, durch das zellspezifische Proteinkombinationsmuster identifiziert werden können und durch das die aufgeführten Nachteile des Stands der Technik überwunden werden.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Zielstrukturen, das folgende Schritte umfaßt: (a) automatisiertes Aufbringen einer Reagenzlösung Y1, die mindestens ein Markiermolekül aufweist, auf ein Objekt X1, das Zellen und/oder Zellmembranen aufweist, die einer Zell- oder Gewebeprobe entstammen; (b) Einwirken der Reagenzlösung Y1 und automatisierte Detektion mindestens eines Markierungsmusters des mit der Reagenzlösung Y1 markierten Objektes X1; (c) Entfernen der Reagenzlösung Y1 vor oder nach der Detektion des Markierungsmusters und Wiederholung der Schritte a) und b) mit weiteren Reagenzlösungen Yn ($n = 2, 3 \dots N$), die jeweils das mindestens eine Markiermolekül und/oder mindestens ein anderes Markiermolekül aufweisen; (d) Zusammenfassen der jeweils in Schritt b) detektierten Markierungsmuster zu einem komplexen molekularen Kombinationsmuster des Objekts X1; (e) Wiederholung der Schritte a) bis d) mit mindestens einem weiteren Objekt Xn ($n = 2, 3 \dots N$), das andere Zellen und/oder andere Zellmembranen aufweist, die einer anderen Zell- oder Gewebeprobe entstammen; (f) Ermitteln mindestens eines Unterschieds zwischen dem Kombinationsmuster des Objektes X1 und dem Kombinationsmuster des Objektes Xn; (g) Identifizierung mindestens einer Reagenzlösung Y1 oder Yn, deren Markierungsmuster den in Schritt f) ermittelten mindestens einen Unterschied verursacht; und (h) Selektion von Molekülen oder Molekülkomplexen, die durch das mindestens eine Markiermolekül der in Schritt g) identifizierten Reagenzlösung Y1 oder Yn gebunden werden, aus einem Homogenat von Zellen und/oder Zellmembranen, die der Zell- oder Gewebeprobe des sich gemäß Schritt f) unterscheidenden Objekts Xn entstammen; und (i) biochemisches Charakterisieren der gemäß Schritt h) selektierten Moleküle oder Molekülkomplexe.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können die Proteinkombinationsmuster einzelner Zellen oder Zellmembranen von unterschiedlichen Zell- oder Gewebeproben vergleichend untersucht werden. Dabei können diejenigen Markiermoleküle identifiziert werden, die
5 beispielsweise an ein bestimmtes Proteinkombinationsmuster oder an einen bestimmten Bereich eines solchen Proteinkombinationsmuster eines ersten Objektes binden, das einer ersten Gewebe- oder Zellprobe entstammt, und die gleichzeitig nicht an ein zweites Objekt binden, das einer zweiten Gewebe- oder Zellprobe entstammt. Mit Hilfe dieser identifizierten Markiermoleküle können nun unter Verwendung eines Probenanteils der ersten Gewebe-
10 und/oder Zellprobe diejenigen molekularen Bereiche (Moleküle oder Molekülkomplexe) des Proteinkombinationsmusters aufgefunden bzw. selektiert und anschließend charakterisiert werden, die durch die identifizierten Markiermoleküle gebunden werden. Auf diese Weise ist es möglich, sowohl die molekulare Zusammensetzung eines Proteinkombinationsmuster, die Anordnung der Moleküle innerhalb des Proteinkombinationsmusters und die Anordnung des
15 Proteinkombinationsmusters innerhalb eines Gewebes oder eine Zelle zu erfassen.

Eine besonders vorteilhafte Weiterbildung der Erfindung sieht vor, daß das in Schritt h) verwendete Homogenat vor Schritt h) durch Molekül- oder Molekülkomplextrennverfahren, insbesondere Proteintrennverfahren, in einzelne Homogenatbestandteile aufgetrennt wird.
20 Auf diese Weise wird die Selektion der Moleküle oder Molekülkomplexe aus dem Homogenat außerordentlich vereinfacht.

Eine weitere vorteilhafte Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens sieht vor, daß das Objekt X1 Zellen und/oder Zellmembranen aufweist, die einer Zell- oder Gewebeprobe eines
25 kranken Patienten entstammen, und daß mindestens ein anderes Objekt Xn Zellen und/oder Zellmembranen aufweist, die einer Zell- oder Gewebeprobe eines gesunden Probanden entstammen. So können krankheitsspezifische Zielstrukturen bzw. die entsprechenden Proteinkombinationsmuster identifiziert werden, so daß aufgrund der Kenntnis dieser krankheitsspezifischen Proteinkombinationsmuster hoch-spezifische Arzneimittel entwickelt
30 werden können, die aufgrund eben dieser Spezifität nahezu nebenwirkungsfrei sind.

Eine weitere vorteilhafte Weiterbildung der Erfindung sieht vor, daß das Verfahren folgenden parallelen Schritt umfaßt: (x) Erstellen jeweils eines Proteinexpressionsprofils von jeweils

einem Probenanteil der Zell- oder Gewebeproben, von denen Zellen und/oder Zellmembranen in die Objekte X1 und Xn eingehen, und Vergleichen des dem Objekt X1 zuzuordnenden Proteinexpressionsprofils mit dem dem Objekt Xn zuzuordnenden Proteinexpressionsprofil, wobei mindestens ein Unterschied festgestellt wird.

5

Weiterhin kann das erfindungsgemäße Verfahren nach Schritt x) folgenden Schritt umfassen: (y) Überprüfen mindestens eines Proteins und/oder mindestens einer Proteinmodifikation, das oder die den in Schritt x) ermittelten Unterschied verursacht, bezüglich einer Bindung des mindestens einen Markiermoleküls der in Schritt g) identifizierten Reagenzlösung Y1 oder Yn. Auf diese Weise kann ermittelt werden, ob es sich bei den durch Vergleich der Proteinexpressionsprofile festgestellten Unterschiede um verfahrensbedingte Artefakte (siehe oben) oder um tatsächlich signifikante Unterschiede handelt, da sie auch durch das erfindungsgemäße Verfahren ermittelt werden konnten. Das erfindungsgemäße Verfahren kann folglich auch als wesentliche Ergänzung zu den bereits bekannten Verfahren verwendet werden.

15

In einer weiteren besonders vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist vorgesehen, daß mindestens ein in Schritt a) und/oder Schritt c) verwendetes Markiermolekül mindestens ein Protein und/oder mindestens eine Proteinmodifikation bindet, das oder die den in Schritt x) ermittelten Unterschied verursacht. Durch bekannte Verfahren können beispielsweise Antikörper oder Liganden entwickelt werden, die Proteine oder Proteinmodifikationen binden, die durch den Vergleich von Proteinexpressionsprofilen als Bereiche von Zielstrukturen ermittelt wurden. Durch den Einsatz dieser Antikörper oder Liganden in dem erfindungsgemäßen Verfahren kann überprüft werden, ob die durch den Vergleich von Proteinexpressionsprofilen ermittelten Proteine Proteinkombinationsmuster erzeugen oder nicht.

20

25

Weiterhin kann mindestens ein in Schritt a) und/oder Schritt c) verwendetes Markiermolekül Fluorochrom-konjugiert sein. Durch eine solche Fluoreszenzmarkierung ist ein Markiermolekül besonders leicht detektierbar.

30

Weiterhin kann mindestens ein in Schritt a) und/oder Schritt c) verwendetes Markiermolekül ein Antikörper sein, wobei der Antikörper einer Antikörperbibliothek entnommen werden

kann, wobei die Antikörperbibliothek eine naive oder eine nicht-naive Antikörperbibliothek sein kann. Bei einer sogenannten naiven Antikörper-Bibliothek handelt es sich um eine Bibliothek, deren Antikörper keine bekannte Spezifität aufweisen, während die Antikörper der nicht-naiven Antikörperbibliothek bekannte Moleküle, wie Proteine oder Glykoproteine erkennen. Durch Verwendung einer nicht-naiven Bibliothek ist also gleich bei Identifizierung eines Antikörpers eine Information dazu vorhanden, welches Molekül oder welche Moleküle der Antikörper bindet.

Weiterhin kann mindestens ein in Schritt a) und/oder Schritt c) verwendetes Markiermolekül ein Ligand sein. Der Ligand kann einer Ligandenbibliothek entnommen werden, wobei die Ligandenbibliothek eine naive oder eine nicht-naive Ligandenbibliothek sein kann. Die Bezeichnungen "naiv" und "nicht-naiv" sind in Analogie zu den obigen Ausführungen zu verstehen.

Nach dem Entfernen der Reagenzlösung gemäß Schritt c) kann ein Waschschrift folgen, in dem eine Waschlösung auf das Objekt X1 aufgebracht und nach einer vorbestimmten Zeit wieder entfernt wird. Auf diese Weise wird ausgeschlossen, daß eine neu aufgebrachte Reagenzlösung durch eine vorher aufgebrachte Reagenzlösung verunreinigt wird.

Schritt d) kann in vorteilhafter Weise durch computergestützte Bildüberlagerungen erfolgen.

Das Verfahren kann beliebig oft wiederholbare Bleichungszyklen, insbesondere nach Schritt b), umfassen. Durch solche Bleichungszyklen wird verhindert, daß Markierungen, die bereits detektiert wurden in einem nachfolgenden Schritt erneut detektiert werden.

Weiter Einzelheiten, Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung eines Ausführungsbeispiels.

In dem Ausführungsbeispiel wird eine Gewebe- oder Zellprobe in zwei Probenanteile unterteilt. Der erste Probenanteil dient als Ausgangsmaterial für die Herstellung eines Homogenats zur biochemischen Proteincharakterisierung nach den bekannten Verfahren. Insbesondere werden Verfahren, wie die 2D-Gelelektrophorese, zur Erstellung von Proteinexpressionsprofilen angewendet.

Der zweite Probenanteil wird zur Herstellung von Gewebeschnitten bzw. von Zellpräparaten mit intakten Zellen verwendet. Handelt es sich bei dem zweiten Probenanteil um einen Gewebeblock, so wird von diesem ein Gewebeschnitt hergestellt. Falls es sich hingegen um Zellen in einer Suspension handelt, werden diese Zellen in intakter Form auf eine Oberfläche, insbesondere auf einen Objektträger aufgebracht. Das auf diese Weise erhaltene erste Objekt wird den folgenden automatisierten Verfahrensschritten unterworfen:

1. Aufnahme einer ersten Reagenzlösung Y1 mit ein oder mehreren fluorochrom-konjugierten Antikörpern einer nicht-naiven Antikörperbibliothek;
2. Aufpipettieren dieser Reagenzlösung Y1 auf das erste Objekt;
3. Inkubation des Objekts mit dieser Lösung Y1 bei einer bestimmten Temperatur, insbesondere Raumtemperatur;
4. Entfernen dieser Reagenzlösung;
5. Einmaliges oder mehrmaliges Auftropfen einer Waschlösung und anschließendes Entfernen;
6. Aufbringen einer Pufferlösung auf das erste Objekt;
7. Detektion des Fluoreszenzverteilungsmuster, wobei bei Verwendung von mehreren Fluorochromen selektive Fluoreszenzaufnahmefilter bei der Bildaufnahme verwendet werden. In diesem Schritt wird festgestellt, ob und an welchen Orten der oder die Antikörper in der Probe Bindungssignale zeigen. Es werden Positiv-Signale und Negativ-Signale gleichermaßen für jeden Bildpunkt bzw. Ortspunkt der Zellen oder des Gewebes des ersten Objektes digital registriert;
8. Aufpipettieren einer weiteren Waschlösung;
9. Bleichen der Probe mit Hilfe einer Fluoreszenzanregung, wobei der Bleichungsvorgang dann beendet ist, wenn keine Fluoreszenz mehr detektiert werden kann;
10. Entfernen der weiteren Waschlösung;
11. Aufnahme einer Reagenzlösung Y2 mit einem oder mehreren ebenfalls fluorochrom-konjugierten Antikörpern einer anderen oder der gleichen Antikörperbibliothek;
12. Aufpipettieren der Reagenzlösung Y2 auf das erste Objekt.

Dieses Verfahren wird durch Wiederholung der Schritte 1 bis 10 fortgesetzt, wobei die Reagenzlösungen Y3, Y4, Y5..Yn verwendet werden, die Antikörper oder Liganden von nicht-naiven oder naiven Bibliotheken enthalten können. Ein- und dasselbe Objekt kann auf

diese Weise mit einer komplett naiven Bibliothek oder mit einer komplett nicht-naiven Bibliothek, oder mit einer gemischt nicht-naiven und naiven Bibliothek untersucht werden.

5 Jeder dieser Verfahrenszyklen (Schritte 1 bis 10) wird durch Registrierung eines korrespondierenden Phasenkontrastbildes oder Differentialinterferenzkontrastbildes beendet.

Aus den jeweils in Schritt 7 registrierten Markierungsmustern werden die existierenden Signalkombinationen und die nicht existierenden Signalkombinationen, die gesamtheitlich ein Kombinationsmuster ergeben, durch computergesteuerte Bildüberlagerungen ermittelt.

10 Dieses für das erste Objekt ermittelte Kombinationsmuster wird mit anderen Kombinationsmustern von anderen Proben bzw. Probanden, Zellen oder Zuständen oder Krankheiten verglichen, die mit denselben Reagenzlösungen nach denselben standardisierten oben aufgeführten Verfahrensschritten analysiert wurden.

15 Sollten bei diesem Vergleich eindeutige, für die untersuchte Probe oder die für einen Zustand, eine Zellform, eine Krankheit oder eine Funktion spezifische Signalkombinationen resultieren, beruhen diese Signalkombinationen auf spezifischen, d.h. selektiven molekularen Interaktionen und charakterisieren daher den Zustand, die Krankheit, die Funktion oder die Zellform. Den ermittelten Signalkombinationen können die entsprechenden Antikörper oder
20 Liganden zugeordnet werden.

Die auf diese Weise herausgefilterten Antikörper und/oder Liganden werden nunmehr dazu eingesetzt, um in dem ersten Probenanteil diejenigen Proteine, Glycoproteine oder andere
25 Kohlenhydratstrukturen "herauszufischen", die diese Liganden oder Antikörper spezifisch binden können. Dazu werden die in der biochemischen Analytik bekannten Verfahren eingesetzt. Die so gefundenen Moleküle können einzelne Molekülspezies oder Komplexe aus verschiedenen Molekülspezies sein. In beiden Fällen stellen sie hoch spezifische Zielstrukturen, insbesondere für die Entwicklung von Arzneimitteln dar.

Dr. Walter Schubert
Deutsche Patentanmeldung

Anwaltsakte: 25187

5

Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Zielstrukturen

ANSPRÜCHE:

10

1. Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Zielstrukturen, folgende Schritte umfassend
- 15 a) automatisiertes Aufbringen einer Reagenzlösung Y1, die mindestens ein Markiermolekül aufweist, auf ein Objekt X1, das Zellen und/oder Zellmembranen aufweist, die einer Zell- oder Gewebeprobe entstammen;
- b) Einwirken der Reagenzlösung Y1 und automatisierte Detektion mindestens eines
20 Markierungsmusters des mit der Reagenzlösung Y1 markierten Objektes X1;
- c) Entfernen der Reagenzlösung Y1 vor oder nach der Detektion des
Markierungsmusters und Wiederholung der Schritte a) und b) mit weiteren
Reagenzlösungen Yn ($n = 2, 3 \dots N$), die jeweils das mindestens eine Markiermolekül
25 und/oder mindestens ein anderes Markiermolekül aufweisen;
- d) Zusammenfassen der jeweils in Schritt b) detektierten Markierungsmuster zu einem komplexen molekularen Kombinationsmuster des Objekts X1;
- 30 e) Wiederholung der Schritte a) bis d) mit mindestens einem weiteren Objekt Xn ($n = 2, 3 \dots N$), das andere Zellen und/oder andere Zellmembranen aufweist, die einer anderen Zell- oder Gewebeprobe entstammen;

f) Ermitteln mindestens eines Unterschieds zwischen dem Kombinationsmuster des Objektes X1 und dem Kombinationsmuster des Objektes Xn;

g) Identifizierung mindestens einer Reagenzlösung Y1 oder Yn, deren Markierungsmuster den in Schritt f) ermittelten Unterschied verursacht;

h) Selektion von Molekülen oder Molekülkomplexen, die durch das mindestens eine Markiermolekül der in Schritt g) identifizierten Reagenzlösung Y1 oder Yn gebunden werden, aus einem Homogenat von Zellen und/oder Zellmembranen, die der Zell- oder Gewebeprobe des sich gemäß Schritt f) unterscheidenden Objektes Xn entstammen; und

i) biochemisches Charakterisieren der gemäß Schritt h) selektierten Moleküle oder Molekülkomplexe.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das in Schritt h) verwendete Homogenat vor Schritt h) durch Molekül- oder Molekülkomplextrennverfahren, insbesondere Proteintrennverfahren, in einzelne Homogenatbestandteile aufgetrennt wird.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Objekt X1 Zellen und/oder Zellmembranen aufweist, die einer Zell- oder Gewebeprobe eines kranken Patienten entstammen, und daß mindestens ein anderes Objekt Xn Zellen und/oder Zellmembranen aufweist, die einer Zell- oder Gewebeprobe eines gesunden Probanden entstammen.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren folgenden parallelen Schritt umfaßt:

x) Erstellen jeweils eines Proteinexpressionsprofils von jeweils einem Probenanteil der

Zell- oder Gewebeproben, von denen Zellen und/oder Zellmembranen in die Objekte X1 und Xn eingehen, und

Vergleichen des dem Objekt X1 zuzuordnenden Proteinexpressionsprofils mit dem dem Objekt Xn zuzuordnenden Proteinexpressionsprofil, wobei mindestens ein Unterschied festgestellt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Verfahren nach Schritt x) folgenden Schritt umfaßt:

y). Überprüfen mindestens eines Proteins und/oder mindestens einer Proteinmodifikation, das oder die den in Schritt x) ermittelten Unterschied verursacht, bezüglich einer Bindung des mindestens einen Markiermoleküls der in Schritt g) identifizierten Reagenzlösung Y1 oder Yn.

6. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens ein in Schritt a) und/oder Schritt c) verwendetes Markiermolekül mindestens ein Protein und/oder mindestens eine Proteinmodifikation bindet, das oder die den in Schritt x) ermittelten Unterschied verursacht.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens ein in Schritt a) und/oder Schritt c) verwendetes Markiermolekül Fluorochrom-konjugiert ist.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens ein in Schritt a) und/oder Schritt c) verwendetes Markiermolekül ein Antikörper ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,

daß der Antikörper einer Antikörperbibliothek entnommen wird, wobei die Antikörperbibliothek eine naive oder eine nicht-naive Antikörperbibliothek ist.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
5 dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens ein in Schritt a) und/oder Schritt c) verwendetes Markiermolekül ein Ligand ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
10 dadurch gekennzeichnet,
daß der Ligand einer Ligandenbibliothek entnommen wird, wobei die Ligandenbibliothek eine naive oder eine nicht-naive Ligandenbibliothek ist.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß nach dem Entfernen der Reagenzlösung gemäß Schritt c) ein Waschschriff folgt, in dem eine Waschlösung auf das Objekt X1 aufgebracht und nach einer vorbestimmten Zeit wieder entfernt wird.
- 20 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß Schritt d) durch computergestützte Bildüberlagerungen erfolgt.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß das Verfahren beliebig oft wiederholbare Bleichungszyklen, insbesondere nach Schritt b), umfaßt.

Dr. Walter Schubert
Deutsche Patentanmeldung

Anwaltsakte: 25187

Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Zielstrukturen

5

ZUSAMMENFASSUNG:

- Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Zielstrukturen, folgende Schritte umfassend:
- 10 Reagenzlösung Y1, die mindestens ein Markiermolekül aufweist, auf ein Objekt X1, das Zellen und/oder Zellmembranen aufweist, die einer Zell- oder Gewebeprobe entstammen;
- b) Einwirken der Reagenzlösung Y1 und automatisierte Detektion mindestens eines Markierungsmusters des mit der Reagenzlösung Y1 markierten Objektes X1;
- c) Entfernen der Reagenzlösung Y1 vor oder nach der Detektion des
- 15 Markierungsmusters und Wiederholung der Schritte a) und b) mit weiteren Reagenzlösungen Yn ($n = 2, 3 \dots N$), die jeweils das mindestens eine Markiermolekül und/oder mindestens ein anderes Markiermolekül aufweisen;
- d) Zusammenfassen der jeweils in Schritt b) detektierten Markierungsmuster zu einem komplexen molekularen Kombinationsmuster des Objekts X1;
- 20 e) Wiederholung der Schritte a) bis d) mit mindestens einem weiteren Objekt Xn ($n = 2, 3 \dots N$), das andere Zellen und/oder andere Zellmembranen aufweist, die einer anderen Zell- oder Gewebeprobe entstammen;
- f) Ermitteln mindestens eines Unterschieds zwischen dem Kombinationsmuster des Objektes X1 und dem Kombinationsmuster des Objektes Xn;
- 25 g) Identifizierung mindestens einer Reagenzlösung Y1 oder Yn, deren Markierungsmuster den in Schritt f) ermittelten Unterschied verursacht;
- h) Selektion von Molekülen oder Molekülkomplexen, die durch das mindestens eine Markiermolekül der in Schritt g) identifizierten Reagenzlösung Y1 oder Yn gebunden werden, aus einem Homogenat von Zellen und/oder Zellmembranen, die der Zell-
- 30 oder Gewebeprobe des sich gemäß Schritt f) unterscheidenden Objektes Xn entstammen; und
- i) biochemisches Charakterisieren der gemäß Schritt h) selektierten Moleküle oder Molekülkomplexe.